

PENGGANDAAN SKALA PRODUKSI ENZIM GLUKOAMILASE DARI LABU KOCOK KE FERMENTOR 10 L

Patuan L. P. Siagian*, A.T. Karossi**, Yetti M. Iskandar***,
Tigor N. Surawidjaja** dan Ngadiman**

* Balai Penerapan dan Rekayasa Kimia, P3KT-LIPI

** Balitbang Kimia Dasar, P3KT-LIPI

*** Balitbang Teknologi Kimia, P3KT-LIPI

INTISARI

Enzim glukoamilase diproduksi di dalam Fermentor 10 L tipe fermentor bejana-aduk dengan menggunakan biakan murni *Rhizopus oryzae* L16 dan substrat pati sagu (*Metroxylon sp.*). Kondisi fermentasi diadaptasi dari hasil penelitian skala labu kock 250 mL dan Fermentor 4 L. Dalam percobaan yang dilaporkan ini, pH fermentasi diatur konstan sebesar 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 pada suhu 30°C. Kecepatan agitasi pada aerasi 1,5 vvm divariasi menjadi 286 rpm, 300 rpm, 350 rpm. Produksi enzim glukoamilase maksimum dicapai dengan kombinasi perlakuan kecepatan agitasi 350 rpm, aerasi 1,5 vvm dan pH 4,0. Pada lama fermentasi 4 hari, aktivitas glukoamilase sebesar 2.285 U/L dan aktivitas spesifik sebesar 9.326 U/g protein. Aktivitas spesifik naik pada hari kelima menjadi 13.631 U/g protein. Untuk mencapai produksi maksimum tersebut, nilai kLa rata-rata terukur sebesar 43 jam⁻¹.

ABSTRACT

Glucoamylase was produced in a 10 L stirred tank fermentor using *Rhizopus oryzae* L16 and sago (*Metroxylon sp*) starch. Fermentation conditions were adapted from the results obtained from shake flask (250 mL) and 4L fermentor experiments. At the present investigation, the temperature was set at 30°C, pHs were at a constant value of 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, and 6.0. Agitation rate at aeration 1.5 vvm were adjusted to 286 rpm, 300 rpm, and 350 rpm (medium volume 6 L). The maximum production of glucoamylase was reached at agitation rate 350 rpm, aeration 1.5 vvm and pH 4.0. At day-4, the glucoamylase activity was 2,285 U/L and its specific activity was 9,326 U/g protein. At day-5 the specific activity increased to 13,631 U/g protein. This maximum production was reached at an average kLa of 43 h⁻¹.

PENDAHULUAN

Enzim glukoamilase atau amiloglukosidase (E.C.3.2.-1.3), disingkat dengan simbol AMG, merupakan produk ekstra selular dari berbagai jenis mikroorganisme seperti *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Rhizopus niveaus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus formosaensis*, *Rhizopus javanicus* (1,2), yang ditumbuhkan dalam medium tertentu dan pada kondisi fermentasi tertentu.

Enzim glukoamilase digunakan secara luas di dalam berbagai industri pangan, misalnya dalam produksi sirup glukosa dan sirup *high fructose*, dan sebagai bahan tambahan pada pembuatan jeli, saribuah dan makanan bayi. Selain untuk keperluan pangan, enzim ini juga sering digunakan pada industri tekstil dan farmasi. Kemampuan enzim ini hampir sempurna sebagai katalisator dalam hidrolisis pati menjadi gula, terutama dengan cara memutus ikatan α -1,4 glikosida dari ujung rantai non pereduksi, selain dengan memutus ikatan α -1,6 dan α -1,3 (3,4,5).

Pemenuhan kebutuhan enzim tersebut di Indonesia saat ini masih dilakukan dengan cara impor. Agar pemenuhan kebutuhan enzim glukoamilase melalui produksi di dalam negeri dapat terealisasi, telah dilakukan berbagai penelitian produksi enzim glukoamilase di laboratorium, dengan menggunakan bahan/substrat dan mikroorganisme yang tersedia di dalam negeri. Hasil-hasil penelitian skala laboratorium yang diperoleh antara lain adalah komposisi medium, konsentrasi inokulum, beberapa parameter fermentasi optimum (suhu, kecepatan agitasi, pH awal medium) dalam memproduksi enzim glukoamilase dari substrat pati sagu (*Metroxylon sp*) dengan menggunakan mikroorganisme *Rhizopus oryzae* L16.

Di dalam laporan ini disajikan hasil penelitian penggandaan skala produksi enzim glukoamilase dari skala labu kock 250 mL dan Fermentor 4 L ke skala Fermentor 10 L, serta hasil penentuan pH optimum untuk fermentasi. Data yang diperoleh dalam penelitian ini dimaksudkan untuk digunakan dalam penelitian penggandaan skala lanjutan ke Fermentor 150 L.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni kapang *Rhizopus oryzae* L16 yang dipelihara dalam medium PDA miring (Potato Dextrose Agar Slants) selama 7 hari pada suhu 30°C.

Inokulum Kapang

Spora hasil biakan *Rhizopus oryzae* L16 berumur 7 hari pada medium PDA miring, disuspensikan dengan air suling steril yang telah dicampur dengan larutan Tween-80 (0,01 %), sebanyak 10 mL per tabung. Selanjutnya suspensi spora ini (10^6 spora / mL) digunakan sebagai inokulum untuk fermentasi produksi enzim glukoamilase, yakni sebanyak 2 % (v/v) dari medium fermentasi.

Medium Fermentasi

Medium fermentasi dibuat dengan komposisi untuk tiap satu liter air suling steril sebagai berikut: tepung sagu 20,0 g, tepung bungkil kedele 7,09 g, ekstrak malt 0,90 g, K_2HPO_4 1,00 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,50 g, KCl 0,50 g, dan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 g. Sebelum fermentasi dilakukan, medium terlebih dahulu disterilisasi selama 15 menit pada suhu $121^\circ C$ dan tekanan 1 atm. Untuk menghilangkan busa yang mungkin timbul digunakan anti busa silicon sebanyak 0,4 g/L medium.

Kondisi Fermentasi

Fermentasi untuk skala Fermentor 10 L dilakukan dengan mengadaptasi kondisi fermentasi dari skala labu kocok 250 mL, yaitu suhu fermentasi $30^\circ C$ dan medium fermentasi dalam suasana asam. Nilai pH kaldu fermentasi pada saat tercapainya aktivitas glukoamilase tertinggi pada skala labu kocok 250 mL, digunakan sebagai dasar untuk percobaan penentuan pH fermentasi optimum pada skala Fermentor 10 L. Nilai pH ini divariasi menjadi 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; dan masing-masing pH dijaga konstan selama proses fermentasi berlangsung.

Nilai pH fermentasi optimum kemudian digunakan dalam percobaan penggandaan skala fermentasi, khususnya untuk parameter kecepatan agitasi dan aerasi, dari Fermentor 4 L (500 rpm, 1-1,5 vvm) ke Fermentor 10 L tipe fermentor bejana-aduk.

Dengan memilih faktor masukan tenaga per volume sebagai konstanta yang harus dipertahankan, maka dari rumus (1) dapat dihitung kecepatan agitasi untuk Fermentor 10 L, yaitu sebesar 286 rpm. Kecepatan agitasi ini divariasi lagi menjadi 300 rpm dan 350 rpm, pada kecepatan aerasi 1,5 vvm.

$$N_2 = N_1 \times \left(\frac{(D_i)_1^{5/3}}{(D_i)_2} \right) \times \left(\frac{(V_2)^{1/3}}{(V_1)} \right) \quad \dots (1)$$

Keterangan: N = Kecepatan impeller (rpm)

D_i = Diameter impeller (cm)

V = Volume medium fermentasi (L)

Penentuan besaran kLa dilakukan dengan metode dinamik yang dikembangkan oleh Humphrey (6). Metode ini didasarkan pada neraca oksigen dinamis dalam biakan curah dengan menggunakan rumus (2)

$$Cl = C^* - \frac{1}{kLa} \left(QO_2X + \frac{dCl}{dt} \right) \quad \dots (2)$$

Keterangan:

kLa = Koefisien pindah massa didasarkan pada phase cair (jam^{-1})

QO_2 = Konsumsi oksigen per unit massa sel ($mM O_2 g^{-1} jam^{-1}$)

X = Massa sel (g)

Cl = Konsentrasi oksigen terlarut aktual pada phase cair ($mM L^{-1}$)

C^* = Konsentrasi oksigen terlarut pada phase gas dalam kesetimbangan dengan tekanan partial oksigen ($mM L^{-1}$)

t = Waktu (jam)

Pada saat aliran udara dihentikan, slope Cl terhadap Waktu dibuat untuk menghasilkan nilai QO_2X . Pada saat udara dialirkan kembali, slope Cl terhadap $QO_2X + dCl/dt$ dibuat untuk menghasilkan nilai resiprok kLa .

Metode Analisis

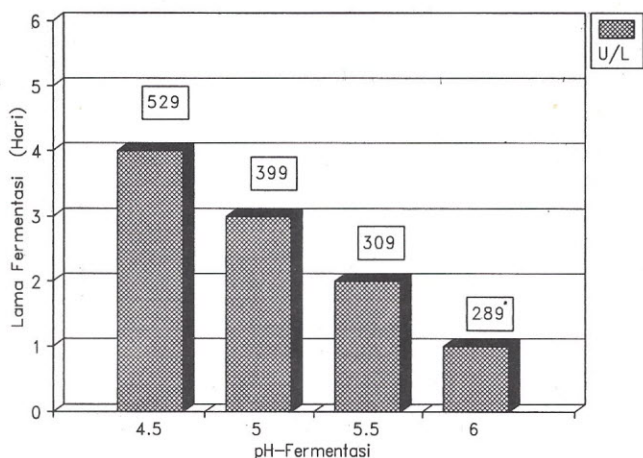
Contoh kaldu fermentasi diambil secara representatif setiap hari (selang 24 jam fermentasi). Terhadap contoh dilakukan penentuan aktivitas glukoamilase dengan metode Ueda yang dimodifikasi (7); penentuan kandungan protein dengan metode Lowry (8) untuk mendapatkan aktivitas enzim spesifik. Penentuan unit aktivitas enzim dilakukan dengan perbandingan hasil yang diperoleh dari kaldu fermentasi dengan glukoamilase standar (SIGMA). Pengukuran kadar glukosa dilakukan dengan metode Nelson-Somogyi (9) setelah hidrolisis asam untuk penentuan jumlah pati tersisa di dalam kaldu fermentasi.

Konsentrasi biomassa ditentukan dengan mengukur berat residu hasil sentrifugasi. Persentase oksigen terlarut diukur dengan menggunakan *dissolved oxygen electrode* tipe logam.

HASIL DAN DISKUSI

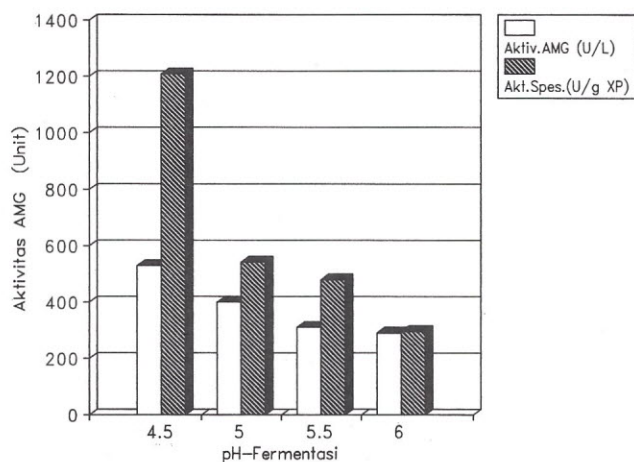
1. Penentuan pH Fermentasi optimum

Hasil percobaan penentuan pH fermentasi optimum, yang dilakukan pada kecepatan agitasi 500 rpm dan aerasi 1 vvm, disajikan dalam Gambar 1 dan Gambar 2. Rincian datanya dapat dilihat pada Tabel 1 hingga Tabel 4.



Gambar 1. Pengaruh pH fermentasi terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai produksi glukoamilase maksimum.

Dari Gambar 1 terlihat, jika pH dipertahankan konstan selama proses fermentasi berlangsung, maka lama fermentasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan enzim glukoamilase maksimum berkisar antara 1 sampai 4 hari. Dengan demikian, lama fermentasi dapat dipersingkat 4 sampai 6 hari dibandingkan dengan hasil fermentasi pada pH bebas (tidak dikontrol pada nilai yang konstan), yang dilaporkan berkisar antara 5 sampai 10 hari (10, 11, 12). Gambar 2 menunjukkan bahwa enzim glukoamilase



Gambar 2. Pengaruh pH fermentasi terhadap aktivitas glukoamilase (U/L) dan aktivitas glukoamilase spesifik (U/g protein).

diproduksi lebih banyak pada pH fermentasi 4,5 dibandingkan pada pH fermentasi yang lebih tinggi. Hal ini mungkin erat kaitannya dengan sifat jamur yang tumbuh baik dalam suasana asam, walau dapat tumbuh pada kisaran pH 2 sampai 8,5 (13), dan sifat enzim glukoamilase yang lebih stabil pada suasana asam, yakni pada pH 4,0 - 5,0 (14, 15).

Tabel 1. Data rinci beberapa parameter yang diamati selama 10 hari fermentasi pada pH 4,5.

500 rpm / 1 vvm						
Lama Fermentasi (Hari)	DO (%)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	100,0	0	1,016	0	0	100,0
1	31,2	7,85	0,568	396	697	30,9
2	75,5	6,84	0,983	515	524	10,0
3	76,9	5,53	0,785	497	633	5,0
4	70,1	5,92	0,438	529	1.208	4,6
5	72,1	5,96	0,557	413	741	5,6
6	76,2	5,72	0,375	339	904	4,7
7	72,5	5,04	0,337	299	887	5,0
8	68,4	4,19	0,655	235	359	5,5
9	70,7	5,21	0,492	142	289	4,9
10	69,3	5,13	0,418	166	397	4,9

Keterangan:

DO = "dissolved oxygen"; AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Dari Tabel 1 dapat dilihat pola pemanfaatan pati dan oksigen terlarut oleh *Rhizopus oryzae*. Karena pertumbuhan maksimum *Rhizopus oryzae* dicapai pada 24 jam fermentasi, yang ditunjukkan dengan konsentrasi biomassa tertinggi, maka dapat diduga bahwa pada kisaran waktu inilah *Rhizopus oryzae* paling aktif memanfaatkan nutrisi dan oksigen terlarut yang ada (ditunjukkan dengan nilai dissolved oxygen (DO) terendah, 31%).

Pada 48 jam fermentasi pati terpakai telah mencapai 90 %, dan nilai DO naik menjadi 75 %. Naiknya nilai DO ini menunjukkan berkurangnya jumlah *Rhizopus oryzae* yang aktif memanfaatkan oksigen terlarut di dalam medium. Dapat juga diduga bahwa sel-sel kapang telah banyak yang mati akibat terlampauinya batas kritis oksigen sekitar jam ke 24.

Produksi enzim glukoamilase pada pH di atas 4,5 juga menunjukkan pola yang sama (Tabel 2, Tabel 3, dan Tabel 4), walau dengan penurunan aktivitas glukoamilase.

Tabel 2. Data rinci beberapa parameter yang diamati selama 10 hari fermentasi pada pH 5,0.

500 rpm / 1 vvm					
Lama Fermentasi (Hari)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	0	0,754	0	0	100,0
1	4,78	1,180	152	129	72,2
2	3,14	0,974	114	117	20,1
3	3,85	0,736	399	542	5,9
4	2,52	0,714	349	489	2,0
5	2,53	0,916	382	417	2,0
6	2,20	0,853	268	314	1,2
7	1,99	0,709	308	434	0,8
8	1,26	0,871	228	262	0,7
9	1,90	0,920	221	240	1,7
10	1,68	0,889	189	212	1,2

Keterangan: AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Persamaan regresi yang menunjukkan hubungan antara pH fermentasi dengan aktivitas glukamilase, adalah sebagai berikut:

$$Y_{AMG X5} = 1584,5 - 251,0 X \quad (R = -0,962)$$

$$Y_{AMG max} = 1232,0 - 162,0 X \quad (R = -0,956)$$

Keterangan:

$Y_{AMG X5}$ = Aktivitas enzim rata-rata 5 hari

$Y_{AMG max}$ = Aktivitas enzim maksimum

X = pH fermentasi

Tabel 3. Data rinci beberapa parameter yang diamati selama 10 hari fermentasi pada pH 5,5.

500 rpm / 1 vvm					
Lama Fermentasi (Hari)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	0	0,167	4	24	100,0
1	5,35	0,808	251	311	62,5
2	3,26	0,646	309	478	23,6
3	2,82	0,642	302	470	10,1
4	1,51	0,687	282	410	6,5
5	3,32	0,875	155	177	2,6
6	2,63	0,758	124	163	2,6
7	2,40	0,306	52	170	2,0
8	2,32	0,225	24	107	1,6
9	1,18	0,189	15	79	1,7
10	1,26	0,109	5	46	1,0

Keterangan: AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Tabel 4. Data rinci beberapa parameter yang diamati selama 10 hari fermentasi pada pH 6,0.

500 rpm / 1 vvm					
Lama Fermentasi (Hari)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	0	0,086	0	0	100,0
1	7,42	0,987	289	293	38,6
2	6,15	1,238	0	0	1,7
3	5,81	0,673	0	0	1,9
4	5,12	0,642	0	0	0,1
5	5,31	0,570	0	0	0,2
6	4,91	0,803	2	2	0,7
7	4,16	0,552	75	136	0,6
8	4,27	0,593	0	0	1,1
9	3,91	0,767	0	0	0,9
10	3,87	0,283	0	0	0,6

Keterangan: AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Hasil yang diperoleh ini kemudian digunakan sebagai dasar percobaan penggandaan skala fermentasi pada tahap penelitian berikutnya, yaitu dengan menjaga pH fermentasi konstan sekitar 4,5 dan dengan mempertahankan kesamaan geometris fermentor.

2. Percobaan Penggandaan Skala Fermentasi

Pada tahap penelitian ini, perhitungan menggunakan persamaan (1) dilakukan untuk menggandakan skala fermentasi dari Fermentor 4 L dengan satu impeller ke Fermentor 10 L dengan dua impeller, dan dengan mempertimbangkan persamaan regresi hubungan pH dengan produksi glukamilase. Kondisi fermentasi tersebut adalah sebagai berikut:

Fermentasi (Batch)	pH	Kecepatan Agitasi (rpm)	Aerasi (vvm)	Volume Medium (L)
1	4,5	286	1,5	6
2	4,5	300	1,5	6
3	4,5	350	1,5	6
4	4,0	300	1,5	6
5	4,0	350	1,5	6

Percobaan dimulai pada pH fermentasi 4,5 dengan kecepatan agitasi 286 rpm, aerasi 1,5 vvm, volume medium 6 L (Batch 1). Hasil fermentasi disajikan pada Tabel 5.

Dari Tabel 5 terlihat bahwa produksi enzim glukamilase maksimum meningkat jika dibandingkan dengan hasil pada Tabel 1, yakni dari 529 U/L menjadi 1.280 U/L, dan dengan aktivitas spesifik yang hampir tiga kali lipat (dari 1.208 U/g protein menjadi 3.316 U/g protein).

Tabel 5. Data rinci beberapa parameter yang diamati pada fermentasi dengan kondisi pH 4,5 / 286 rpm / 1,5 vvm

Hasil Analisis						
Lama Fermentasi (Hari)	DO (%)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	100,0	0	0,279	0	0	100,0
1	2,7	4,65	0,579	158	273	47,3
2	7,3	5,82	1,009	1.064	1.054	1,3
3	77,8	5,29	0,606	906	1.495	0,6
4	86,7	4,22	0,570	1.105	1.938	0,5
5	69,2	2,81	0,386	1.280	3.316	0,6

Keterangan:

DO = "dissolved oxygen"; AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Dengan meningkatkan agitasi menjadi 300 rpm (Batch 2) dan 350 rpm (Batch 3), terlihat dari data pada Tabel 6 dan Tabel 7 bahwa aktivitas spesifik masih cenderung meningkat. Aktivitas glukamilase maksimum pada percobaan fermentasi dengan agitasi 350 rpm (Tabel 7) dicapai lebih awal, yakni sebesar 1.296 U/L dengan lama fermentasi 4 hari, daripada percobaan fermentasi dengan agitasi 286 rpm (Tabel 5), yakni sebesar 1.280 U/L dengan lama fermentasi 5 hari. Rendahnya aktivitas glukamilase yang diperoleh pada percobaan fermentasi dengan agitasi 300 rpm (Tabel 6) dibandingkan dengan hasil yang

diperoleh pada percobaan lainnya, mungkin disebabkan oleh menurunnya konsentrasi biomassa pada tahap dini (hari kedua) secara mendadak.

Tabel 6. Data rinci beberapa parameter yang diamati pada fermentasi dengan kondisi pH 4,5 / 300 rpm / 1,5 vvm

Hasil Analisis						
Lama Fermentasi (Hari)	DO (%)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	100,0	0	0,095	36	379	100,0
1	23,0	6,79	0,082	120	1.463	47,9
2	59,4	2,89	0,315	748	2.375	11,1
3	66,4	1,80	0,651	536	823	2,1
4	59,5	2,34	0,225	33	147	1,8
5						

Keterangan:

DO = "dissolved oxygen"; AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

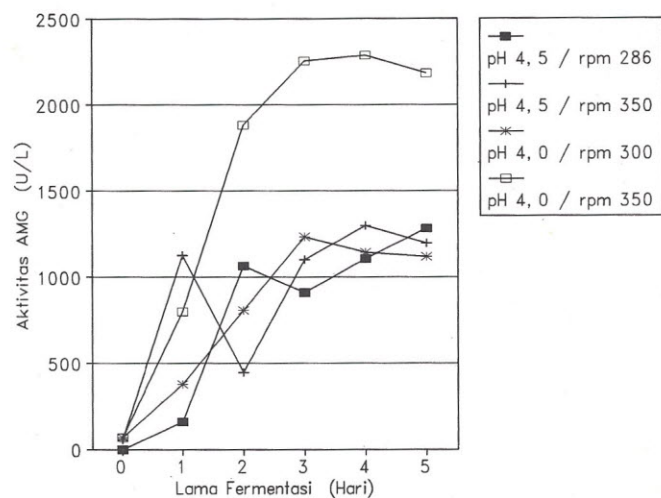
Tabel 7. Data rinci beberapa parameter yang diamati pada fermentasi dengan kondisi pH 4,5 / 350 rpm / 1,5 vvm

Hasil Analisis						
Lama Fermentasi (Hari)	DO (%)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	100,0	0	0,123	54	439	100,0
1	28,1	7,28	0,154	1.126	7.312	39,8
2	56,3	7,48	0,203	444	2.187	13,0
3	80,1	6,46	0,378	1.101	2.913	6,9
4	73,2	5,95	0,333	1.296	3.892	4,1
5	67,9	5,30	0,472	1.196	2.534	3,5

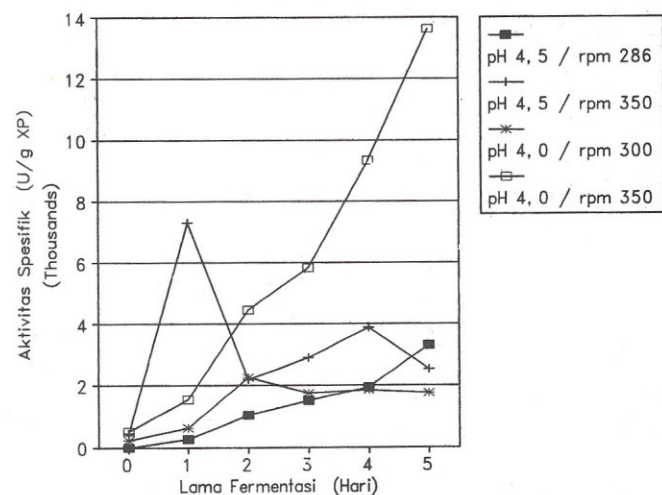
Keterangan:

DO = "dissolved oxygen"; AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Fermentasi pada pH 4,0 (Batch 4 dan Batch 5) ternyata memberikan hasil yang lebih baik dalam memproduksi enzim glukoamilase daripada fermentasi pada pH 4,5. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas glukoamilase maksimum yang dapat dicapai lebih awal (Tabel 8). Aktivitas glukoamilase maksimum dapat ditingkatkan lagi hampir dua kali lipat dengan mengatur kecepatan agitasi 350 rpm (Tabel 9), yakni pada hari keempat sebesar 2.285 U/L dengan aktivitas spesifik 9.326 U/ g protein. Aktivitas spesifik ini meningkat lagi pada hari kelima menjadi 13.631 U/g protein.



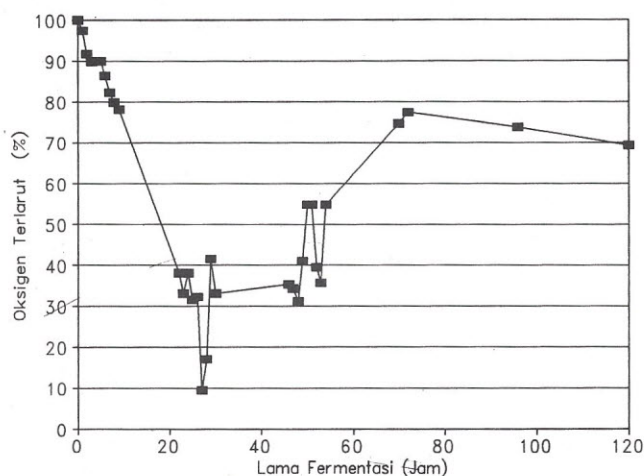
Gambar 3. Perubahan aktivitas glukoamilase (U/L) pada berbagai pH dan kecepatan agitasi selama lima hari fermentasi.



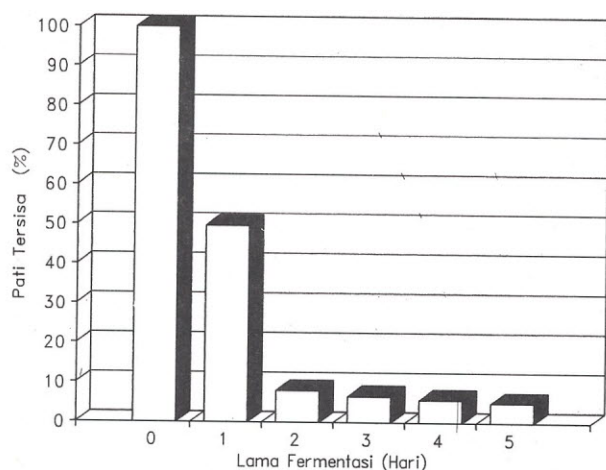
Gambar 4. Perubahan aktivitas glukoamilase spesifik (U/g protein) pada berbagai pH dan kecepatan agitasi selama lima hari fermentasi.

Gambar 3 dan Gambar 4 menunjukkan lebih jelas perbedaan pengaruh perlakuan terhadap produksi enzim glukoamilase.

Hasil pengukuran nilai k_La pada fermentasi dengan produksi enzim glukoamilase maksimum tertinggi, yakni kecepatan agitasi 350 rpm dan aerasi 1,5 vvm pada dua kali pengukuran adalah sebesar 44,1 jam^{-1} dan 41,7 jam^{-1} . Nilai ini sedikit lebih rendah dari k_La yang dilaporkan oleh Rousset dan Schlich (16) pada agitasi 300 rpm, aerasi 1 vvm, dengan menggunakan biakan murni *Aspergillus niger*, yakni sebesar 49 jam^{-1} . Perbedaan ini mungkin sedikit banyak dipengaruhi oleh jenis bioreaktor dan medium yang tidak sama.



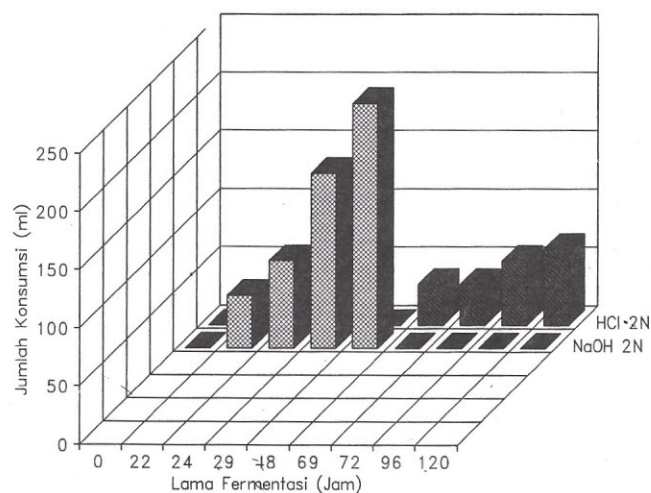
Gambar 5. Perubahan persentase oksigen terlarut di dalam medium fermentasi pada kombinasi perlakuan optimum (agitasi 350 rpm, pH 4,0).



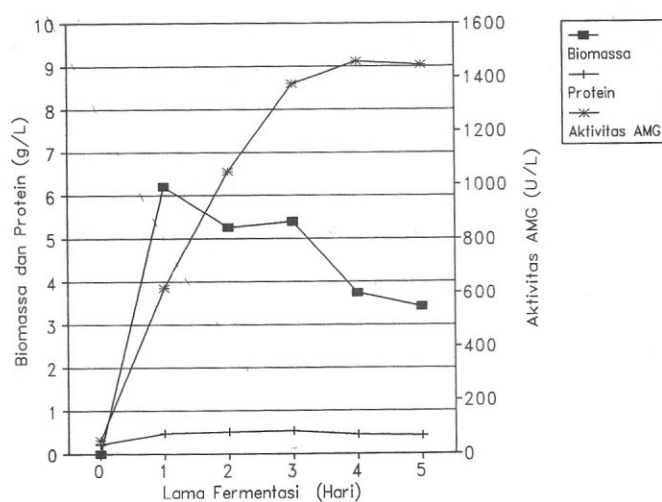
Gambar 6. Perubahan persentase pati tersisa di dalam medium fermentasi pada kombinasi perlakuan optimum (agitasi 350 rpm, pH 4,0).

Pola pemanfaatan oksigen terlarut dan pati dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6, yang menunjukkan kekritisan oksigen pada hari kedua fermentasi. Pada saat ini memang terlihat pertumbuhan maksimum *Rhizopus oryzae* dengan aktivitas yang sangat tinggi. Jumlah konsumsi HCl 2N dan NaOH 2N yang dibutuhkan untuk mempertahankan pH fermentasi pada 4,0 ditunjukkan pada Gambar 7. Pada dua hari pertama NaOH dibutuhkan untuk menetralkan asam yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* dalam pertumbuhannya, dan diikuti dengan penggunaan HCl untuk menetralkan basa yang timbul sebagai akibat perombakan zat-zat organik menjadi NH_3 .

Perubahan nilai rata-rata konsentrasi biomassa, kadar protein dan aktivitas glukamilase dari lima batch fermentasi terhadap lama fermentasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 7. Konsumsi NaOH dan HCl untuk mempertahankan pH 4,0 selama lima hari fermentasi.



Gambar 8. Perubahan nilai rata-rata konsentrasi biomassa, kadar protein dan aktivitas glukamilase (5 Batch).

Tabel 8. Data rinci beberapa parameter yang diamati pada fermentasi dengan kondisi pH 4,0 / 300 rpm / 1,5 vvm

Lama Fermentasi (Hari)	Hasil Analisis					
	DO (%)	Biomassa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	100,0	0	0,302	69	228	100,0
1	53,0	7,02	0,597	374	626	32,2
2	65,6	2,50	0,355	806	2.270	13,7
3	83,5	3,91	0,696	1.230	1.767	8,7
4	80,6	2,72	0,619	1.142	1.843	5,2
5	74,0	4,38	0,633	1.118	1.766	3,0

Keterangan:

DO = "dissolved oxygen"; AMG = Glukamilase; U = Unit; XP = Protein

Tabel 9. Data rinci beberapa parameter yang diamati pada fermentasi dengan kondisi pH 4,0 / 350 rpm / 1,5 vvm

Lama Fermentasi (Hari)	Hasil Analisis					
	DO (%)	Bio-massa (g/L)	Protein (g/L)	Aktivitas AMG (U/L)	Aktivitas Spesifik (U/g XP)	Pati Sisa (%)
0	100,0	0	0,130	68	523	100,0
1	20,6	5,86	0,515	798	1.549	49,5
2	31,5	5,21	0,420	1.878	4.471	7,9
3	78,4	5,89	0,385	2.252	5.849	6,6
4	74,7	2,04	0,245	2.285	9.326	5,7
5	70,1	1,20	0,160	2.181	13.631	5,0

Keterangan:

DO = "dissolved oxygen"; AMG = Glukoamilase; U = Unit; XP = Protein

Persamaan regresi yang menunjukkan hubungan pengaruh antar variabel/parameter yang diamati hingga batch kelima adalah sebagai berikut:

Hubungan antara konsentrasi biomassa (X, g/L) dengan produksi AMG (Y, U/L):

$$Y_{AMG} = 487,36 + 127,50 X \quad (R = 0,501)$$

Hubungan antara kadar protein cairan fermentasi (X, g/L) dengan produksi AMG (Y, U/L):

$$Y_{AMG} = -581,29 + 3733,05 X \quad (R = 0,736)$$

Hubungan antara konsentrasi biomassa (X, g/L) dengan kadar protein cairan fermentasi (Y, g/L):

$$Y_{XP} = 0,2344 + 0,0471 X \quad (R = 0,939)$$

Dari persamaan-persamaan regresi di atas, terlihat rendahnya ukuran ketergantungan variabel aktivitas glukoamilase terhadap variabel konsentrasi biomassa ($R^2 = 0,251$) dan variabel kadar protein ($R^2 = 0,541$). Hal ini menunjukkan kemungkinan adanya enzim jenis lain yang ikut terproduksi dalam jumlah yang relatif banyak. Karena itu perlu juga diteliti teknik perangsangan produksi glukoamilase agar lebih dominan oleh sel-sel *Rhizopus oryzae* dan/atau eliminasi metabolit yang bersifat inhibitor terhadap glukoamilase.

KESIMPULAN

Produksi enzim glukoamilase dengan pH fermentasi terkontrol, yaitu pada pH 4,0, dapat mempersingkat lama fermentasi untuk mencapai aktivitas maksimum.

Produksi glukoamilase tertinggi dalam Fermentor 10 L tipe bejana-aduk dengan dua impeller, diperoleh pada kecepatan agitasi 350 rpm dan aerasi 1,5 vvm. Pada lama fermentasi 4 hari dicapai aktivitas glukoamilase sebesar 2.285 U/L dengan aktivitas spesifik sebesar 9.326 U/g protein. Aktivitas spesifik tersebut meningkat menjadi 13.631 U/g protein pada hari kelima fermentasi.

Nilai kLa untuk mendapatkan produksi glukoamilase tertinggi tersebut adalah 42 jam⁻¹ sampai 44 jam⁻¹.

PUSTAKA

1. W.Crueger dan A.Crueger. *Biotechnology: A Text Book of Industrial Microbiology*, Waisbaden (1982).
2. G.Jagnow dan W.Dawid. *Biotechnologie*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1985).
3. T.Mitsue, B.C.Saka dan S.Weda. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* cultured on steamed rice. *J. of Applied Biochemistry* 1: 410-422 (1979).
4. S.Schwimmer. *Source Book of Food Enzymology*. The Avi Publ. Co., Connecticut (1981).
5. A.Wiseman. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. John Wiley and Sons, New York (1985).
6. F.Kargi dan M.Moo-Young. Transport Phenomena in Bioprocess. Di dalam: *Comprehensive Biotechnology* (Editor: Cooney dan Humphrey). Pergamon Press, Oxford (1985).
7. S.Ueda, Y.Fujio, P.Suyanadana dan P.Attasampunna. Alcoholic fermentation of raw cassava starch by *Rhizopus koji* without cooking. *Biotech & Bioeng.* 26: 315-319 (1984).
8. S.P.Colowick dan N.O.Kaplan. *Methods in Enzymology*. Acad. Press Inc., New York (1957).
9. N.Nelson. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. of Biol. Chem.* 153: 357-380 (1944).
10. F.E.P.Bangun. Amobilisasi glukoamilase dari *Rhizopus oryzae* L16 dengan menggunakan matriks agar-agar komersial. Skripsi. Universitas Padjadjaran, Bandung (1993).
11. N.H.Rini (1993). Isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim glukoamilase dari *Rhizopus oryzae* L16. Skripsi. Universitas Padjadjaran, Bandung.
12. Z.U.Linar, Ngadiman dan A.T.Karossi. Produksi glukoamilase *Rhizopus oryzae* skala Fermentor 1-2 Liter dan 4 Liter. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, 4(1), 19-23 (1994).
13. W.C.Frazier and D.C.Weshoff. *Food Microbiology*. Tata McGraw-Hill Publ. Co. Ltd., New Delhi (1978).
14. S.Ueda, R.Obga dan S.Kano. Fractionation on the glucoamylase system from Black-Koji mold and the effects of adding isoamylase and alpha-amylase on amylolysis by the glucoamylase. *Die Starke* 26: 374 (1975).
15. K.Kulp. Carbohydrase. Di dalam: *Enzyme in Food Processing* (Editor: G. Redd). Academic Press, New York (1975).
16. S.Rousset and P.Schlich. Amylase production in submerged culture using principal component analysis. *J. of Fermentation and Bioengineering* 68: 339-343 (1989).